

淫羊藿总黄酮促进免疫功能低下小鼠 IL-2 和 NK 活性的实验研究

孙奕¹, 王景明¹, 骆永珍^{2*}

(1. 武警医学院, 天津 300162 2. 成都中医药大学, 四川 成都 610075)

摘要: 目的 探讨淫羊藿总黄酮对免疫功能低下小鼠的免疫促进作用。方法 分别采用淫羊藿总黄酮 325、650 和 1 300 mg/(kg·d) 与羟基脲 320 mg/(kg·d), ig 小鼠, 同时以正常和模型小鼠作对照, 实验第 11 天用 ³H-TdR 掺入法和同位素释放法检测各组小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性, 并计算脾脏指数。结果 淫羊藿总黄酮有拮抗羟基脲抑制模型小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性的作用, 尤以 650 mg/(kg·d) 剂量组效果最为显著。模型组小鼠体重和脾脏指数与正常组和治疗组相比显著减少。结论 淫羊藿总黄酮对免疫功能低下小鼠有良好免疫促进作用。

关键词: 淫羊藿总黄酮; 羟基脲; 白细胞介素-2; NK 细胞活性

中图分类号: R286.95 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)07-0635-03

Effects of total flavones from *Epimedium L.* on IL-2 and NK activity in immunodepressant mice

SUN Yi¹, WANG Jing-ming¹, LUO Yong-zhen²

(1. Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China;

2. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

Key words total flavones from *Epimedium wushanense* T. S. Ying; hydroxyurea; IL-2; NK cell activity

淫羊藿又名仙灵脾, 传统医学认为其具有补肾壮阳、强筋骨、祛风湿等作用。淫羊藿总黄酮 (TFE) 是从小檗科淫羊藿属植物巫山淫羊藿的茎叶中提取的总黄酮类成分。其中含有淫羊藿苷 (icariine), 去氧甲基淫羊藿苷 (desomethyl icariine), β -去氢淫羊藿素 (β -anhydroicaritin) 等多种黄酮苷以及木脂素 A、B, 生物碱 (木兰碱) 等。王天然^[1]等研究发现淫羊藿黄酮是淫羊藿促进免疫功能的有效成分。为探讨淫羊藿总黄酮拮抗羟基脲对小鼠的免疫抑制作用^[2]的机制, 本研究观察了不同剂量淫羊藿总黄酮对服羟基脲小鼠的 IL-2 和 NK 细胞活性的影响。

1 材料

1.1 实验动物: 昆明种健康小鼠 (本校实验动物中心提供), 雌雄各半, 体重 (20 \pm 2) g, 在实验条件下适应 1 周后, 随机分为 5 组, 进行试验。

1.2 药品: 淫羊藿总黄酮 (TFE), 从巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying 中提取, 用生理盐水分别配成 13、26 和 52 g/L 3 个浓度, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。N-羟基脲 (N-hydroxy-urea), 中国科学院上海生物化学研究所提供。

1.3 试剂: RPMI-1640 (美国 Gibco), ³H-TdR (中国科学院上海原子能研究所), Com A (Sigma 公司)。

2 方法

2.1 造模及给药方法: 参照刘福春^[3]造模方法, 以羟基脲 320 mg/(kg·d) ig 小鼠, 正常组每日 ig 生理盐水 0.5 mL, 治疗组参照成人每千克体重用量 (乘 10~20 倍), 分别以 TFE 325、650 和 1 300 mg/(kg·g) ig 小鼠, 连续 10 d, 实验第 11 天称体重和脾脏湿重, 检测各组小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性。

2.2 脾细胞悬液制备: 无菌取出小鼠脾脏后, 用 100 目钢网研磨脾脏制备细胞悬液, 吸入离心管后静置 10 min, 弃去沉淀的团块, Hanks 液洗 2 遍, 用完全 RPMI-1640 培养基调至所需浓度作为小鼠 NK 活性的效应细胞及小鼠 IL-2 的产生细胞。

2.3 IL-2 活性测定方法: 参照尹廷贵方法^[4], 取前述方法制备的实验小鼠脾细胞, 加 Com A 刺激 48 h, 再用指示细胞 (小鼠胸腺细胞) 与此上清共育, 同时作指示细胞加 IL-2 对照, 培养 60 h, 加 ³H-TdR 12 h 后收集测 cpm 值, 根据标准曲线求得标

* 收稿日期: 2001-10-26

作者简介: 孙奕 (1958-), 女, 蒙古族, 辽宁法库县人, 副教授, 博士研究生, 1982年毕业于黑龙江中医学院, 1995年7月获成都中医药大学免疫学硕士学位, 同年调入武警医学院免疫教研室工作, 1996年晋升副教授, 2000年9月考入华中科技大学同济医学院攻读博士学位, 研究方向中药免疫学和移植免疫学。Tel: (022) 60578096 E-mail: drsunyi@yahoo.com.cn

本 IL-2 活性 (U/mL)

2.4 NK 细胞活性测定方法: 制备小鼠 NK 活性的效应细胞, 每孔 $100\mu\text{L}$ 标记靶细胞 $\times 10^5$ (YAC-1) 与标记同位素 37 kBq 混匀, 37°C 培养 20~24 h, 弃上清, 加入 DNA 酶和胰酶各 $100\mu\text{L}$ (分别含 $10\mu\text{g}$ DNA 和 0.6 mg 胰酶), 充分混匀, 放置 1 h 后收获每管上清 0.5 mL 置另外的试管中。对照管以 FCS-1640 代替效应细胞。用 γ 计数器分别测每管上清和细胞部分的 cpm 值

NK 细胞活性 (%) = $\frac{\text{实验管 } ^3\text{H-TdR 释放率} - \text{对照管 } ^3\text{H-TdR 自然释放率}}{\text{实验管 } ^3\text{H-TdR 释放率} - \text{对照管 } ^3\text{H-TdR 自然释放率}}$

2.5 统计学处理: 采用 t 检验

3 结果

表 1 各实验组体重、IL-2、NK 细胞活性和脾脏指数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg·d)	n	体重 (g) (第 11 天)	IL-2 (U/mL)	NK (%)	脾脏指数 (脾重 mg/体重 g)
对照组	-	13	22.1 ± 1.96*	24.16 ± 9.21**	80.93 ± 6.752*	49.8 ± 4.22
模型组	-	11	19.0 ± 2.10	10.87 ± 1.89	69.27 ± 13.810	46.9 ± 5.34
TFE	325	12	21.3 ± 2.04	14.53 ± 3.21*	81.62 ± 6.592*	52.6 ± 5.81*
	650	12	21.9 ± 1.98*	26.98 ± 15.72*	82.34 ± 10.662*	53.4 ± 6.02
	1300	12	21.4 ± 2.16	18.28 ± 16.04*	82.78 ± 12.402*	51.3 ± 4.74

与模型组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

4.1 模型对照组小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性明显降低, 与正常组相比有显著性差异, 显示用羟基脲建立免疫功能低下小鼠模型是成功的。而且模型对照组小鼠还出现了明显的类似中医“阳虚”的体征, 淫羊藿为临床常用的补阳药物, 用其主要有效成分 TFE 进行治疗, 符合“因证论治”、“虚则补之”的中医理论, 本实验中 TFE 治疗组小鼠“阳虚”体征均明显减轻, 正常组和治疗组体重略有增加, 而模型对照组小鼠体重反而减少, 表明 TFE 对改善羟基脲所致小鼠整体机能状态有明显的促进作用。

4.2 IL-2 主要由 CD_4^+ 和 CD_8^+ T 细胞产生, 此外 NK 细胞、LAK 细胞亦可产生, IL-2 分布于 T 细胞、B 细胞、NK 细胞及 $\text{M}\Phi$ 表面。IL-2 通过与上述细胞膜表面的 IL-2R 结合, 而引起广泛的生物学效应, 是参与免疫应答的重要细胞因子^[5]。IL-2 活性在很大程度上决定 T 细胞依赖性免疫应答的强度^[6]。NK 细胞通过直接接触和 ADCC 效应对多种肿瘤细胞和病毒感染细胞有较强的杀伤作用。此外还有重要的免疫调节和对造血系统的调节作用^[6]。而静止的 NK 细胞必须经活化后才能发挥其杀伤作用。NK 细胞膜表面表达中等亲和力的 IL-2R, IL-2 可正反馈上调 NK 细胞活性。TFE 对模型小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性及升高脾脏指数的增强作用, 显示 TFE 对免疫功能低下小鼠具有良好的免

疫促进作用。

3.1 实验小鼠一般状态: 模型对照组第 6 天起表现活动迟缓、弓背蜷缩、毛枯不荣、肢尾冷等体征并伴有体重减轻, 显著低于对照组 ($P < 0.05$), TFE 治疗组上述体征出现较迟 (6~8 d), 程度较轻, 且无体重下降 (略有增加), 与对照组相比, 无显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 1

3.2 TFE 对抗羟基脲鼠 IL-2 NK 细胞活性和脾脏指数的影响: TFE 治疗组与模型对照组相比 IL-2 NK 细胞活性、脾脏指数明显升高, 有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而与正常组相比则差异无显著性, 表明 TFE 可拮抗羟基脲对小鼠的免疫抑制作用, 见表 1

4 讨论

4.3 在 TFE 325 和 650 mg/(kg·d) 实验组间 IL-2 活性呈一定程度的剂量依赖关系 (见表 1), 而 TFE 1300 mg/(kg·d) 剂量组未明显随剂量增加的 IL-2 和 NK 细胞活性增加, 提示在此基础上再加大 TFE 给药量, 可能对治疗组小鼠 IL-2 和 NK 细胞活性没有进一步促进作用, 反而有可能出现 TFE 的毒副作用。

4.4 羟基脲的作用环节主要在于抑制核苷酸还原酶的活性, 从而抑制 DNA 合成。淋巴细胞是分裂增殖旺盛的细胞, 对羟基脲抑制 DNA 合成的影响, 会远较一般细胞敏感, 故细胞活性也易受到抑制。TFE 很可能是通过拮抗羟基脲对核苷酸还原酶的抑制, 从而促进核酸合成而达到增强免疫功能的作用。对此机制刘福春等^[7]报道淫羊藿和肉苁蓉提取物可以促进羟基脲模型小鼠的 DNA 合成率, 这一结果也可作一佐证。

参考文献:

- [1] 王天然, 邢善田, 周金黄. 淫羊藿总黄酮促进免疫功能的实验 [J]. 中成药研究, 1987, (2): 27-28.
- [2] 杨静玉, 于庆海, 李爽, 等. 淫羊藿总黄酮免疫功能低下小鼠的免疫增强作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 1998, 15(2): 94-97.
- [3] 刘福春, 张家庆, 李菊仙, 等. 羟基脲制造“阳虚”动物模型的研究 [J]. 吉林中医药, 1984, (5): 31-33.
- [4] 尹廷贵, 吴慧, 苏祖兰, 等. 用小鼠胸腺细胞快速检测白细胞

- 介素-2生物活性的探讨 [J]. 华西医科大学学报, 1986, 7(4): 273-275.
- [5] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [6] 杨贵贞. 医学免疫学 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1999.
- [7] 刘福春, 丁光霞, 李菊仙, 等. 淫羊藿肉蓉对羟基脲所致“阳虚”动物骨髓细胞 DNA合成率的影响 [J]. 中国中药杂志, 1991, 16(10): 620-622.

严重烫伤大鼠组织 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性改变及三七保护作用探讨

袁新初, 周乾毅, 杨逢春, 张 伟, 程贵荣*

(武汉科技大学医学院 组胚教研室, 湖北 武汉 430080)

摘要: 目的 观察严重烫伤后大鼠组织 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性变化及三七对烫伤大鼠的保护作用。方法 采用 Wistar 大鼠制作 40% 体表面积 (TBSA) III 度烫伤模型, 在伤后 4, 8, 24 和 48 h 分别取大鼠心、肝和肾组织匀浆, 用比色法测定 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性变化。结果 严重烫伤后大鼠各器官组织内 ATPase 活性均呈进行性下降, 并在伤后 48 h 达最低点, 但不同组织的酶活性下降模式不尽相同; 同时, 三七治疗组大鼠心、肝和肾组织 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 的活性均呈进行性增加, 与单烫伤组大鼠比较各指标均有显著性差异。结论 三七对严重烫伤后大鼠重要生命器官有保护作用。

关键词: 大鼠; 烫伤; 三七; 腺苷三磷酸酶;

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2002)07-0637-02

Activity changes of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase in tissue of seriously scalded rats and protect effect of *Panax notoginseng*

YUAN Xin-chu, ZHOU Qian-yi, YANG Feng-chun, ZHANG Wei, CHENG Gui-yong

(Department of Histology and Embryology of Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430080, China)

Key words rat; scalded; *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; ATPase

严重烫伤常引起持续、剧烈的机体高代谢反应, 不仅造成局部损伤, 而且还可引起远隔部位器官的损伤。重要内脏器官的代谢功能紊乱, 成为多种烧伤并发症甚至多器官功能不全综合症 (MODS) 发生发展的起点。ATP 作为机体内各种生理活动最直接的供能物质, 它的产生依赖于 ATPase 的活性, 而 ATPase 是普遍存在于细胞质及细胞膜上的一种蛋白, 在物质运送、能量转换及信息传递方面具有重要的作用。本实验观察了严重烫伤后不同时相点心、肝和肾组织 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 的活性变化, 并探讨三七对严重烫伤大鼠的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验分组及动物模型^[1]制作: 选用健康 Wistar 大鼠 85 只, 体重 (250±30) g, 雌雄兼用, 由湖北省医学科学院实验动物中心提供。随机分为正常

对照组 (5 只)、单烫伤组 (40 只)、治疗组 (40 只)。单烫伤组和治疗组用 8% 硫化钡脱去大鼠背部约 40% 体表面积 (TBSA) 的毛, 洗净擦干, 以 10% 水合氯醛 300 mg/kg ip 麻醉大鼠后置于沸水中 16 s, 造成 40% TBSA III 度烫伤 (病理切片证实)。治疗组在大鼠烫伤后补给生理盐水抗休克的同时, ip 三七注射液 150, 70, 35 mg/kg, 每 8 小时给药 1 次, 正常对照组及单烫伤组 ip 等容生理盐水。

1.2 观察指标及方法: 分别于伤后 4, 8, 24 和 48 h 活杀大鼠, 并立即取心、肝和肾组织置于 4℃ 冷生理盐水中, 洗去表面的残血, 滤纸吸干, 准确称取 1 g, 用生理盐水液制成 10% 组织匀浆备用^[2], 采用 Lowary 法, 测定 ATPase 酶活^[3]。

1.3 统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。

2 结果

* 收稿日期: 2001-09-02

作者简介: 袁新初 (1953-), 男, 湖南人, 副教授, 毕业于湖南医学院临床医学系, 现在武汉科技大学医学院任教, 主要从事中草药对人体重要脏器保护作用的研究。Tel (027) 86864153